

Mikrobiološka dijagnostika invazivne meningokokne bolesti u Hrvatskoj – jesu li standardne metode i danas optimalne metode

Suzana BUKOVSKI^{1,2}, doc. dr. sc., prim.,
dr. med., specijalist kliničke mikrobiologije
Marko JELIĆ¹, dipl. ing molekularne
biologije
Marija GUŽVINEC¹, dr. sc., dipl. ing
molekularne biologije

- ¹Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb
²Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Osijek

Ključne riječi

invazivna meningokokna bolest
molekularne metode
cjepiva

Key words

invasive meningococcal disease
molecular methods
vaccines

Primljeno: 2014-02-25

Received: 2014-02-25

Prihvaćeno: 2014-03-06

Accepted: 2014-03-06

Znanstveni rad

Potvrda dijagnoze invazivne meningokokne bolesti (IMB) često je onemogućena zbog rane primjene antibiotika. Nekultivacijske molekularne metode postaju zato novi "zlatni standard" u mikrobiološkoj dijagnostici IMB u razvijenim zemljama i preporučeno pomagalo u ostalim zemljama. Uvođenje molekularnih testova 2005. godine u rutinsku dijagnostiku IMB u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" značajno su ubrzali i unaprijedili postavljanje etiološke dijagnoze. U razdoblju od siječnja 2005. do travnja 2013 godine više od 50 % slučajeva IMB potvrđeno je samo *real time* PCR testom. Pojava invazivnih penicilin-rezistentnih izolata *N. meningitidis* nameće potrebu praćenja gena *penA*, odgovornog za rezistenciju na penicilin. Dobra osjetljivost izolata na ciprofloksacin, rifampicin i ceftriakson omogućava nam primjenu ovih antibiotika u profilaksi prema sadašnjim preporukama struke. Serotipizacija i serosubtipizacija nisu više preporučene rutinske metode u karakterizaciji izolata meningokoka. Cjepiva protiv meningokoka grupe B pripremljena od proteina vanjske membrane (OMV cjepiva) mogla su biti primijenjena uspješno uglavnom samo u nacionalnim okvirima. Međutim s razvojem reverzne vakcinologije i pojavom multikomponentnih MenB cjepiva (fHBP, NHBA, NadA, OMP Novi Zeland – P1.7-2,4) postaje značajno genotipizirati lokalne izolate i pratiti obuhvat zaštićenosti populacije ponuđenim novim cjepivima u nacionalnim okvirima. To će zasigurno biti dio našeg budućeg rada samostalno i/ili u suradnji s europskim referentnim centrima za meningokoke i Europskim centrom za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC).

Microbiological diagnostics of invasive meningococcal disease in Croatia – are standard methods optimal methods even today

Scientific paper

Culture-confirmed diagnosis of invasive meningococcal disease (IMD) is often hindered by early antibiotic treatment. Nonculture molecular standardized methods are now essential tools and almost "new gold standard" in microbiological diagnostics of IMD in developed world and recommended tool in other parts of the world. The introduction of the *real time* PCR in routine diagnostics of IMD at the University Hospital for Infectious Diseases (UHID) in 2005 significantly improved etiological diagnosis of disease. More than 50 % of IMD cases of hospitalized patients in UHID from January 2005 to April 2013 were confirmed only by *real time* PCR. The emergence of penicillin resistant *N. meningitidis* invasive isolates leads us to the introduction of the detection of *penA* gene responsible for penicillin resistance. Nevertheless, IMD prophylaxis in Croatia may continue to be based on the current recommendations of epidemiological service due to proved susceptibility to all antibiotics commonly used for this purpose, rifampicin, ciprofloxacin and ceftriaxone. Serotyping and serosubtyping are not any more recommended in routine characterization of meningococcal isolates. OMV vaccines against *N. meningitidis* serogroup B, prepared from outer membrane proteins, have not proved to be successful supranational. However, after the development of reverse vaccinology and multicomponent MenB (fHBP, NHBA, NadA, OMP New Zealand – P1.7-2,4) vaccine genotyping was placed as an important tool for following up characteristics of invasive meningococcal isolates as well as following up of vaccine coverage with the available new and future MenB vaccines or perhaps broad range vaccines. This will undoubtedly be a part of our future work on the national level and/or in cooperation with other European national reference centres and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Uvod

Invazivna meningokokna bolest (IMB) uzrokovana Gram-negativnom diplokoknom bakterijom *Neisseria meningitidis* je bolest koja može biti dramatičnog kliničkog izraza, tijeka i ishoda. U razvijenim zemljama bolest se javlja sporadično ili u manjim epidemijama. U svijetu se mogu naći i endemska žarišta IMB, a u subsaharskom "meningitičnom pojasu" i hiperendemska žarišta s izrazito visokom incidencijom bolesti [1]. Obzirom na neujednačene kriterije i načine prijavljivanja IMB, na temelju dostupnih podataka može se samo procijeniti da od meningokoknog meningitisa svake godine oboljeva oko 500 000 osoba i umire oko 50 000 oboljelih. Razvijene zemlje imaju svoj sustav prijavljivanja IMB i bilježe incidenciju od manje od 1 slučaja IMB na 100 000 stanovnika, dok je u Africi incidencija i do 1000 slučajeva na 100 000 stanovnika [1].

Učestalost IMB najveća je u djece do 5 godina starosti. U grupi adolescenata ponovo se bilježi porast incidencije bolesti. Pojavnost IMB povezuje se s boravkom u zatvorenim kolektivima i prenapučenim domaćinstvima s lošijim životnim uvjetima. Upozorava se da je rizik za oboljevanje 600 do 1000 puta veći za ukućane oboljelog od IMB nego za ostalu populaciju. U nekim zemljama zabilježena je i sezonska pojava IMB s povećanim brojem oboljelih u kasnu zimu i rano proljeće kada je smanjena apsolutna vlažnost zraka [1].

Jedna od osobitosti uzročnika IMB je paleta različitih polisaharidnih antigena u kapsuli bakterije. Temeljem toga poznato je 13 seroloških grupa meningokoka, a IMB uzrokuje 6 serogrupa (A, B, C, W, X, Y). Učestalost određene serogrupe meningokoka kao uzročnika IMB ovisi o zemljopisnom položaju. Najčešći uzročnik velikih epidemija u nerazvijenim zemljama Afrike i Azije je *N. meningitidis* grupe A [2]. Širenje pojedinih izrazito invazivnih epidemijskih klonova serogrupe A meningokoka povezuje se s učestalim pandemijama. U prvom desetljeću ovog stoljeća u "meningitičnom" pojasu zabilježene su epidemije uzrokovane meningokokom serogrupe C i W135. Bolest uzrokovana serogrupom W135 proširila se i međunarodno među hodočasniciima u Hajj [2]. U većini zemalja Europe sporadične slučajeve IMB najčešće uzrokuje meningokok serogrupe B. Međutim prevalencija određene serogrupe meningokoka razlikuje se i na europskom kontinentu od zapada do istoka, od sjevera do juga. Neke su se europske zemlje, kao Engleska i Španjolska, suočile s manjim epidemijama IMB uzrokovanim serogrupom C, dok su slučajevi uzrokovani serogrupom W135, A i Y u Europi i dalje sporadični [3]. U velikim europskim zemljama uočene su i regionalne varijacije serogrupa meningokoka [4]. Značajnu ulogu u tim varijacijama ima komponenta staničnog zida *N. meningitidis* porin, protein vanjske membrane. Porin ima imunogene osobine, a uključen je u adheziju i prijanjanje meningokoka na

površinu epitela. Većina vrsta *Neisseria* ima izražen jedan porinski protein, ali *N. meningitidis* posjeduje gen za oba porinska proteina, porA i porB. Ovi proteini doprinose virulenciji meningokoka i osnova su za *in vitro* fenotipsku i genotipsku karakterizaciju. Temeljem njihove sličnosti ili razlika, utvrđivanjem tipova i subtipova meningokoka, mogu se pratiti epidemije IMB uzrokovane posebice serogrupama B i C meningokoka. Vrlo važna osobina meningokoka je njihova genetska raznolikost koja se djelomično može objasniti horizontalnim rekombinacijama unutar i između vrsta kao i akvizicijom genetskog materijala od blisko srodnih vrsta *Neisseria*, ali i ostalih rodova bakterija prisutnih u dišnom sustavu. Upravo ove osobine meningokoka su također vrlo značajne za odabir mikrobioloških metoda koje će se primjenjivati u dijagnostici i tipiziranju [5].

Čovjek je jedini domaćin *N. meningitidis*. Meningokok obitava u ždrijelu, a postaje ozbiljan suparnik zdravlju svog domaćina tek kada prijeđe barijeru sluznice i razmnoži se u krvi. Bolest može proći bez jasnih simptoma kao prolazna, inaparentna bakterijemija, ali i kao fatalna, fulminantna septikemija. Vrlo često tijekom faze bakterijemije meningokok prelazi hemato-likvorsku barijeru te uzrokuje i meningitis. Uzročnik može doprijeti i do drugih organa te uzrokovati artritis, penumoniju ili čak perikarditis [1]. Simptomi meningokokne bolesti u ranoj fazi su najčešće nespecifični. Tek kad bakterijski lipopolisaharidni endotoksin angažira imunološki sustav domaćina pojave se simptomi koji mogu kliničaru omogućiti postavljanje dijagnoze IMB. Jedan od znakova koji se smatra patognomoničnim je osip koji ne nestaje na pritisak staklenom čašom ili pločicom. Međutim, osip se može pojaviti u kasnoj fazi bolesti, a osim toga u dječjoj dobi osipe mogu uzrokovati i mnogi drugi mikroorganizmi. Upravo zato je moguće da kliničar ne prepozna IMB ili se odluči za krivu dijagnozu. Svi postupnici za pristup bolesnicima sa sumnjom na IMB ističu da se i pri najmanjoj sumnji na IMB primjena antibiotika ne smije odgađati [1].

Unatoč takvim preporukama mikrobiološka laboratorijska dijagnostika ima značajnu ulogu i odgovornost u postavljanju etiološke dijagnoze.

Mikrobiološka dijagnostika

Laboratorijska definicija (LD) IMB, koja podrazumijeva dokazivanje prisutnosti uzročnika IMB u uzorcima oboljelog uzetih iz normalno sterilnih mjesta, najčešće uzorcima krvi ili likvora, tradicionalno se temelji na sugestivnim i definitivnim kriterijima [5].

Važan mogući kriterij LD je detekcija Gram-negativnih diplokokova svjetlosnim mikroskopom u preparatu likvora ili sumnjive kožne lezije obojenom po Gramu. Metoda je jednostavna za izvođenje i može se primjeniti odmah po dobivanju uzorka, te se u kratkom vremenu, u

minutama, ovom metodom može potvrditi sumnja na IMB. Specifičnost metode je visoka, ali osjetljivost se kreće od 30 do 70 % i uvelike ovisi o stadiju bolesti i ranije primjenjenoj antibiotskoj terapiji. Međutim, iz kožnih lezija moguće je mikroskopski dokazati prisutnost meningokoka i 48 sati nakon primjene antibiotika. Prisutnost velikog broja plimorfonuklearnih stanica u uzorku likvora često je razlog lažno negativnog mikroskopskog nalaza. Negativan nalaz ne isključuje IMB. Brzi test aglutinacije iz uzorka likvora ili ostalih sterilnih uzoraka sa specifičnim serumom vezanim na lateks čestice, ne preporuča se kao mogući kriterij za rutinski rad budući da je njegova osjetljivost manja od 30 % [5].

Jedan od mogućih kriterija je detekcija specifičnih imunoglobulina klase M (IgM) u visokom titru na antigene proteina vanjske membrane ili značajnog porasta titra IgM protutijela u parnim uzorcima seruma uzetim u razmaku od dva tjedna, kao i visokim titrovima IgG klase. Metoda nije prihvaćena u rutinskom radu u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima i upotrebljava se prvenstveno u istraživačke svrhe [5].

Definitivni kriterij je istovremeno i zlatni standard mikrobiološke dijagnostike, izolacija *N. meningitidis* metodom uzgoja na laboratorijski pripremljenim hranilištima iz krvi i/ili likvora. Potvrda prisutnosti *N. meningitidis* u ispitivanom uzorku ovom metodom zahtijeva najmanje 24 sata uzgoja u određenim laboratorijskim uvjetima. Prednost metode je mogućnost određivanja antibiotske osjetljivosti izolata. Osjetljivost metode za uzorak krvi je oko 50 %, odnosno 5 % i manje ako je započeta terapija antibiotikom. Za uzorak likvora je osjetljivost metode i do 95 %, ali samo prije terapije i drastično se smanjuje nakon terapije. Iz nazofaringealnih briseva osoba s IMB u oko 50 % slučajeva je moguće izolirati *N. meningitidis* i mogućnost izolacije ne ovisi značajno o primjeni antibiotika. No, rutinsko uzimanje briseva nazofarinksa ili ždrijela osobama koje su bile u bliskom kontaktu s oboljelom osobom se ne preporuča [5].

Poslijednjih godina definitivni kriterij LD IMB obuhvaća i detekciju specifične meningokokne DNK sekvencije u krvi ili likvoru primjenom testa amplifikacije nukleinskih kiselina, najčešće metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*real time* PCR).

Metoda se primjenjuje u mikrobiološkim laboratorijima razvijenih zemalja. Specifična je, osjetljiva, pouzdana i brza u detekciji i karakterizaciji *N. meningitidis* [6]. Postoje brojni protokoli za rutinsku primjenu od kojih je jedan od najčešće prihvaćenih onaj Taha i suradnika, a koji za detekciju *N. meningitidis* koriste gen za konzervirani protein vanjske membrane, *ctrA* gen [7–9]. Za određivanje serogrupe *N. meningitidis* ovom metodom koriste se različiti geni uključujući one koji kodiraju glikoziltransferazu (*sacD*, *wmmB*, *lcbB*), polysialiltransferazu (*siaD*), polimerazu (*synF*, *synG*), fosfotransferazu (*capZC*, *wmmA*, *xcbA*) ili D-arabinoza-5-fosfat izomerazu (*cap29EH*) [10, 11, 12,

13]. Također su razvijene molekularne metode, tzv. multi-pleks PCR, kojima se istovremeno detektiraju najčešći vanbolnički uzročnici invazivnih bolesti, posebice u djece, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* [14–16].

Primjena molekularnih tehnika u tipiziranju *N. meningitidis* uvedena je kako bi se mogla istražiti povezanost epidemijskih slučajeva i spriječiti njihovo daljnje širenje [17, 18]. Istraživači su nastojali razumjeti varijacije sojeva meningokoka i njihovu evoluciju [19, 20]. Pri tome su uočili brojne različite uzorke epidemija. Izbor metode tipiziranja ovisi o informacijama koje bi trebale rasvijetliti epidemiološke nedoumice ili odnose između pojedinih sojeva meningokoka [21]. Za *N. meningitidis* serogrupe A, koja nema veliku sklonost rekombiniranju tzv. visoko klonsku populaciju, brojne molekularne tehnike mogu dati podatke o odnosu među ispitivanim sojevima. To su metode ribotipiziranja, multilokus enzimna elektroforeza – MLEE, elektroforeza u pulzirajućem polju – *pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE, tipiziranje multilokus sekvencija – *multilocus sequence typing* – MLST ili PCR s proizvoljno odabranim početnicama (primers) – RAPD. U istraživanju sojeva koji ne pripadaju u visoko klonske populacije, serogrupe B i C meningokoka izoliranih tijekom lokalnih epidemija, za genotipizaciju se može upotrijebiti samo PFGE, MLEE ili MLST metode. Ukoliko se trebaju usporediti osobine novog izolata s osobinama poznatog hiper-endemičnog klona, koriste se kvantitativne metode kao što su MLEE i MLST [22].

S napretkom u istraživanju i razvoju cjepiva protiv meningokoka grupe B u shemi karakterizacije *N. meningitidis* značajno mjesto je dobila analiza nukleotidnih sekvenci *porA* gena [9, 23]

Europska grupa za praćenje meningokoka (EMGM) također preporuča primjenu molekularnih metoda, sekvenciranje ciljnog gena, za određivanje osjetljivosti meningokoka na antibiotike i to sekvenciranje gena *penA* i *rpoB* za osjetljivost na penicilin G i rifampicin [9, 24, 25].

Materijal i metode

U radu su analizirani rezultati mikrobiološke obrade uzoraka krvi i likvora bolesnika s IMB koji su liječeni u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" (KIB) od 2005. do travnja 2013. godine. Od siječnja 2005. godine u KIB se u rutinsku mikrobiološku dijagnostiku uvodi primjena metode *real time* PCR. Kultivacija kliničkih uzoraka rađena je prema standardnim postupcima i uključivala je mikroskopski pregled Gram-preparata iz uzorka likvora, kultivaciju na krvnom i čokoladnom agaru, te u tekućem hranilištu s triptozom pri temperaturi od 36±1 °C uz 5 % CO₂ tijekom 18 do 24 sata. Presumptivna identifikacija se temeljila na nalazu Gram-negativnih diplokokka u mikroskopskom preparatu i pozitivnom

testu oksidaze. Konačna identifikacija temeljila se na ispitivanju metaboličkih osobina *N. meningitidis*, stvaranju kiseline iz glukoze i maltoze kao i dokazivanju rezistencije na kolistin. Po potrebi se provodilo prošireno testiranje primjenom komercijalnog biokemijskog sustava VITEK 2.0 (BioMerieux). Testom aglutinacije (Pastorex™ Meningitis, BioRad) određena je serogrupa *N. meningitidis*.

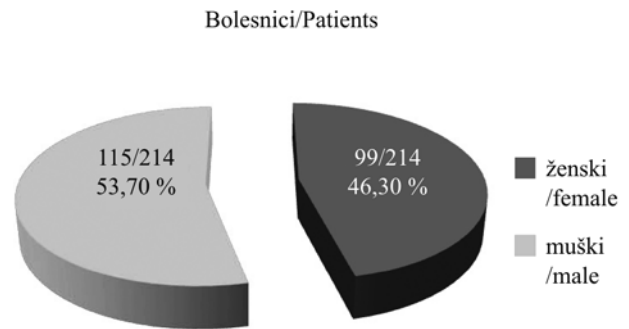
Izolatima *N. meningitidis* je ispitivana osjetljivost na antibiotike metodom disk difuzije Kirby-Bauer prema preporukama CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) do 1. siječnja 2011. godine, a od tada prema preporukama EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST *Clinical Breakpoints*) testom gradijent difuzije određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) primjenom komercijalnog E-testa (AB Biodisk, Solna, Švedska). Testirana je osjetljivost izolata na penicilin, ceftriakson, ciprofloksacin, rifampicin, a do 2011. godine i na sulfametoksazol-trimetoprim (interpretacija samo prema CLSI preporukama).

U detekciji DNK *N. meningitidis* metodom *real time* PCR prema Corless i suradnicima iz krvi, likvora i ostalih sterilnih tekućina, koristila se sekvencija za detekciju konzerviranog gena za transport, *ctrA*. Istovremeno se klinički uzorak može testirati i na prisutnost *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *L. monocytogenes* upotrebom specifičnih početnica za svaki od navedenih uzorčnika [14]. Izolacija DNK radila se primjenom komercijalnog kita QIAamp DNA minikits (Qiagen, Hilden, Germany). Amplifikacija se odvijala prema *in house* protokolu upotrebom Light Cycler 2.0 (Roche Molecular Diagnostics, USA). Za određivanje serogrupe *N. meningitidis* koristile su se sekvencije za detekciju *sacB* gena (serogrupa A) te *synD* (serogrupu B), *synE* (serogrupu C) i *synG/synF* za grupu W135 odnosno Y prema *in house* protokolu. DNK izolata pohranjena je na -20 °C.

Imunoenzimskim testom monoklonskim protutijelima prema metodi Abdillahi i Poolman [26, 27] serotipizirano i serosubtipizirano je 2006. godine 10 izolata u Grazu u Institutu za medicinsku mikrobiologiju i higijenu, a 3 izolata su i genotipizirana određivanjem *porA* gena. Također, 2007. godine određivanjem *porA* gena je genotipizirano još 34 izolata u referentnoj jedinici za meningokoke u Manchesteru koja je dio Grupe medicinske mikrobiologije u Manchesteru (*Manchester Medical Microbiology Partnership – MMMP*).

Rezultati

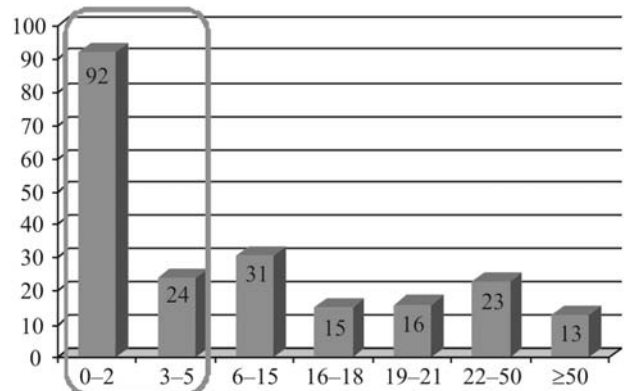
U Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u razdoblju od siječnja 2005. godine do travnja 2013. godine liječeno je 214 bolesnika s invazivnom meningokoknom bolesti. Bilo je 115 (53,7 %) oboljelih muškaraca i 99 (46,3 %) žena (Slika 1). Najčešće su bolesnici s IMB bila djeca u dobi do 5 godina (116 od 214 ili 54,2 %), posebno



Slika 1. Spolna distribucija bolesnika s dokazanom invazivnom meningokoknom bolesti

Figure 1. Gender distribution of patients with confirmed invasive meningococcal disease

u dobnoj skupini do 2 godine starosti (92 od 116 ili 79,3 %). U djece od 3 do 5 godina zabilježeno je manje oboljelih (24 od 214 ili 11,2 %) nego u skupini djece od 6 do 15 godina (31 od 214 ili 14,5 %). Među adolescenatima od 15 do 21 godine uočen je jednak broj (31 ili 14,5 %) oboljelih i to u skupini od 15 do 18 zabilježeno je 7 % (15/214), a u onih od 19 do 21 godine 7,5 % (16/214) oboljelih. U skupini odraslih od 22 do 50 godina bilo je 23 od 214 (10,7 %) oboljelih, dok je najmanje oboljelih bilo u skupini osoba od 50 i više godina starosti (13 od 214 ili 6,1 %) (Slika 2).

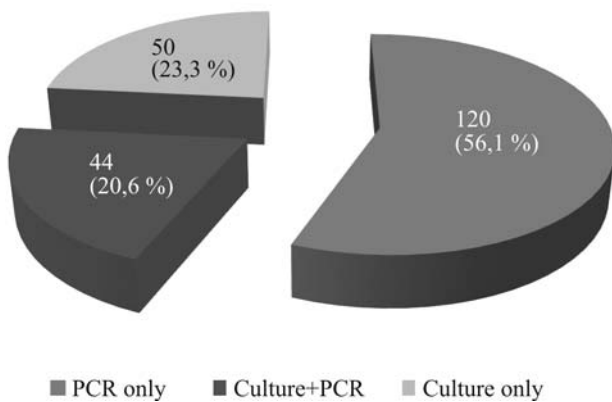


Slika 2. Dobna distribucija bolesnika s dokazanom invazivnom meningokoknom bolesti

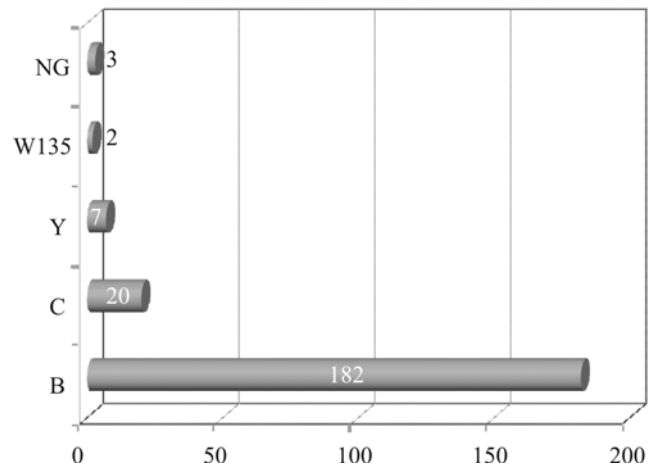
Figure 2. Age distribution of patients with invasive meningococcal disease

Dijagnoza IMB je čak u 120/214 (56,1 %) oboljelih potvrđena isključivo *real time* PCR metodom, a u još 44/214 (20,6 %) bolesnika *real time* PCR i kultivacijom. Samo u 50/214 (23,3 %) oboljelih je dijagnoza potvrđena samo kultivacijom kliničkog uzorka (Slika 3).

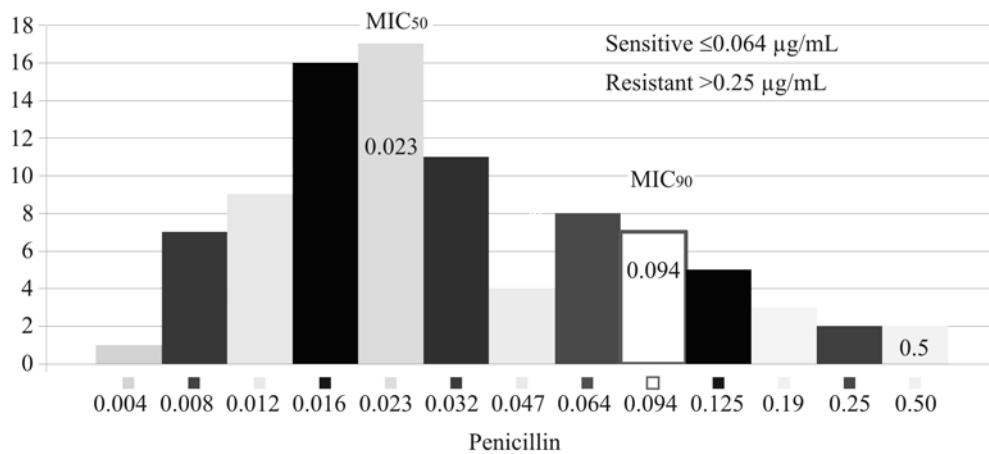
Većina izolata je pripadala serogrupi B *N. meningitidis* 182/214 (85,1 %), 20/214 (9,3 %) izolata su bila serogrupe C, 7/214 (3,3 %) serogrupe Y i 2/214 (0,9 %) serogrupe W135 (Slika 4).



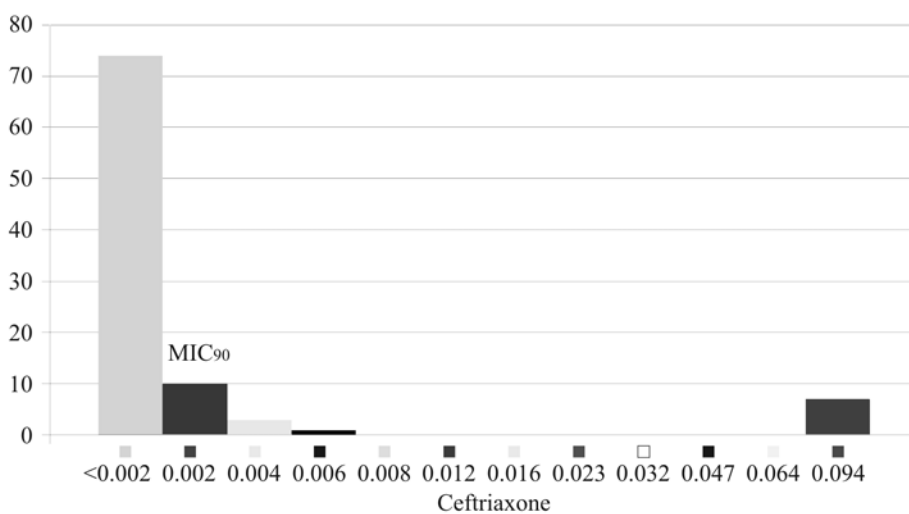
Slika 3. Metode detekcije *N. meningitidis*
 Figure 3. Detection methods of *N. meningitidis*



Slika 4. Distribucija izolata *N. meningitidis* po serogrupama
 Figure 4. Serogroup distribution of *N. meningitidis* isolates



Slika 5. *N. meningitidis* (92 izolata) – minimalne inhibitorne koncentracije (MIK µg/mL) za penicilin
 Figure 5. *N. meningitidis* (92 isolates) – minimal inhibitory concentration (MIC µg/mL) to penicillin

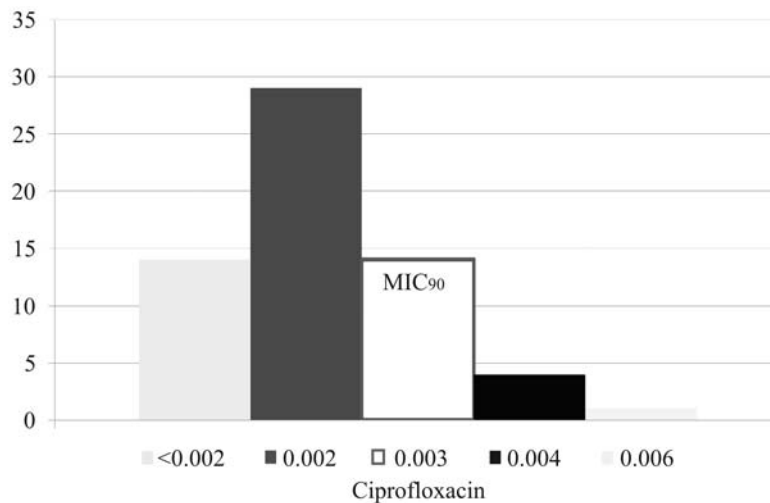


Slika 6. *N. meningitidis* (91 izolata) – minimalne inhibitorne koncentracije (MIK µg/mL) za ceftriakson
 Figure 6. *N. meningitidis* (91 isolates) – minimal inhibitory concentration (MIC µg/mL) to ceftriaxone

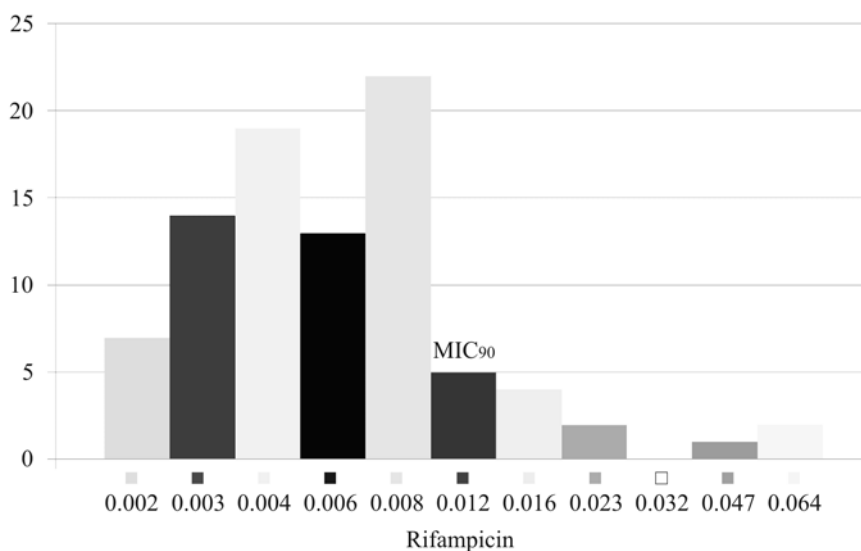
Antibiotska osjetljivost izolata *N. meningitidis* na penicilin određena je za 92 izolata. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za penicilin se kretala u rasponu od 0,004 µg/mL do 0,50 µg/mL. MIK₅₀ je bio 0,023 µg/mL, a MIK₉₀ iznosio je 0,094 µg/mL (Slika 5). Osjetljivost na ceftrijakson je ispitana za 91 izolat, a MIK se kretao od 0,002 µg/mL do 0,094 µg/mL. MIK₉₀ za ceftrijakson je bio 0,002 µg/mL (Slika 6). Na ciprofloksacin je bilo testirano 62 izolata. MIK se kretao u rasponu od 0,002 µg/mL do 0,006 µg/mL, a MIK₉₀ je bio 0,003 µg/mL (Slika 7). Osjetljivost za rifampicin je određena za 92 izolata s MIK vrijednošću u rasponu od 0,002 µg/mL do 0,064 µg/mL i MIK₉₀ od 0,016 µg/mL (Slika 8). Osjetljivost na sulfometok-

sazol-trimetoprim je određena za 74 izolata, a MIK se kretao u rasponu od manje od 0,002 µg/mL do više od 32 µg/mL i MIK₉₀ od 1,5 µg/mL (Slika 9).

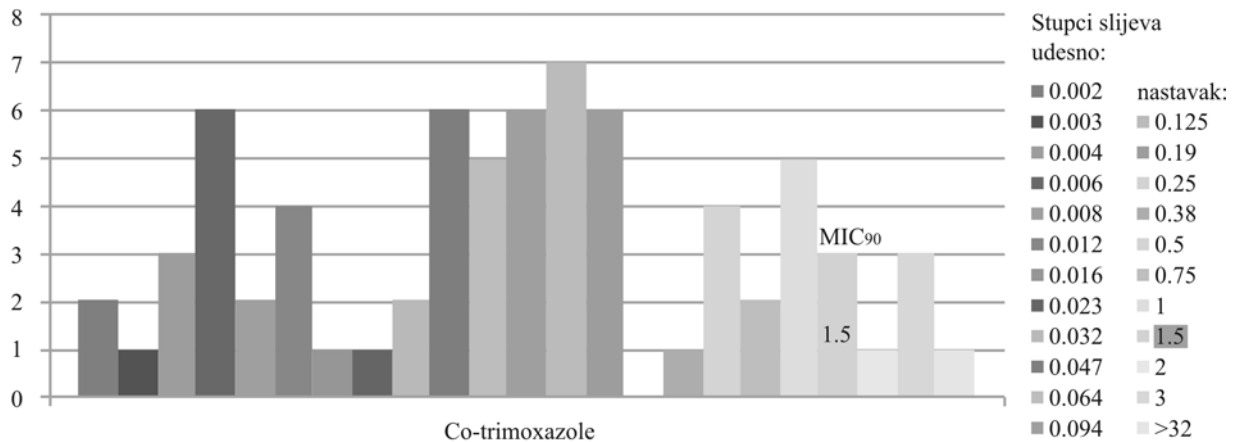
Četiri izolata su svrstana u serotip B:4:NT, dva izolata serosubtip B:4:1.5, a ostali izolati su pripadali različitim serotipovima i serosubtipovima (Slika 10). *PorA* sekvenciranje pokazalo je da su svi izolati različitih genotipova. Izolat serogrupe B oboljelog trogodišnjeg djeteta sa sepsom i meningitisom bio je genosubtip P1.5-1,2-2,36-2. Izolat serogrupe B četverogodišnjeg djeteta također sa sepsom i meningitisom, je bio P1.7-2, a izolat serogrupe B odraslog bolesnika sa sepsom i meningitisom je bio P1.22,9,35-1 (Tablica 1).



Slika 7. *N. meningitidis* (62 izolata) – minimalne inhibitorne koncentracije (MIK µg/mL) za ciprofloksacin
Figure 7. *N. meningitidis* (62 isolates) – minimal inhibitory concentration (MIC µg/mL) to ciprofloxacin



Slika 8. *N. meningitidis* (92 izolata) – minimalne inhibitorne koncentracije (MIK µg/mL) za rifampicin
Figure 8. *N. meningitidis* (92 isolates) – minimal inhibitory concentration (MIC µg/mL) to rifampicin

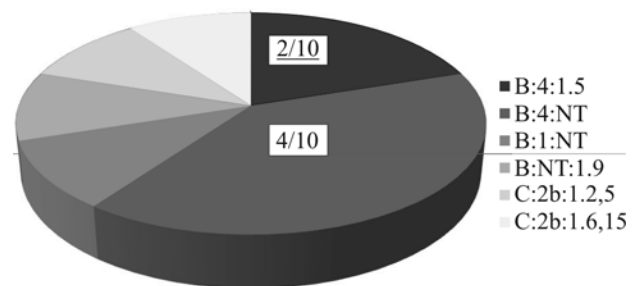


Slika 9. *N. meningitidis* (74 izolata) – minimalne inhibitorne koncentracije (MIK µg/mL) za sulfametoksazol-trimetoprim
Figure 9. *N. meningitidis* (74 isolates) – minimal inhibitory concentration (MIC µg/mL) to sulfamethoxazole-trimethoprim

Tablica 1. *porA* genotipizacija invazivnih izolata *N. meningitidis*

Table 1. *porA* genotyping of invasive isolates of *N. meningitidis*

Broj izolata/Number of isolates	PorA		
	VR1	VR2	VR3
2006			
1	1.5-1	2-2	36-2
1	1.7-2		
1	1.22	9	35-1
2007			
5	5-1	10-4	36-2
1	5-1	2-2	36-2
2	5-3	2-16	36-2
2	5	2	36-2
6	7-2	4	37
1	7-2	13-1	35-1
1	7-2	13-2	35-1
1	7-2	16	35
1	7-2	1	35-1
2	19	15	36
1	19	14	36
1	19	15-1	36
1	18	25	38-1
1	18	25-1	38-1
2	18-7	9	35-1
1	22	14	36
1	22	14-6	36-2
1	22-1	14	38
1	12-1	13	35-1
1	12-1	13-1	35-1
1	21	16	37-1



Slika 10. Serotip i serosubtip invazivnih izolata *N. meningitidis* testiranih 2006. godine

Figure 10. Serotype and serosubtype of *N. meningitidis* invasive isolates tested in 2006

Izolati kojima je *porA* sekvencijski tip određivan u Manchesteru su pokazali veliku raznolikost u sve tri varijabilne regije. Najčešći genotip je bio P1.7-2,4,37 (6 od 34 izolata) te P1.5-1,10-4,36-2 (5 od 34 izolata). Ostali su genotipovi bili zastupljeni s jednim ili dva izolata (Tablica 1).

Rasprava

Incidenција invazivne meningokokne bolesti u Hrvatskoj nije visoka kao i u većini razvijenih zemalja, a bolest se uglavnom javlja sporadično. Od IMB u KIB prosječno je godišnje liječeno 25 bolesnika s podjednakom spolnom zastupljenošću. Najviše je bilo oboljele djece do 2 odnosno do 5 godina starosti što je uobičajena distribucija u razvijenim zemljama. U djece od 6 do 15 godina incidencija bolesti je viša nego u skupini od 3 do 5 godina, vjerojatno zbog toga što su u tako definiranoj skupini i mlađi adolescenti od 11 do 15 godina. Manji broj oboljelih bio je u skupini starijih adolescenata, i to po 7% ako se promatraju odvojeno skupine od 16 do 18 i od 19 do 21 godine. Međutim ako se skupina starijih adolescenata promatra zajedno

(15 odnosno 16 oboljelih) tada je incidencija ista kao u skupini od 6 do 15 godina (14,5 %). S obzirom da se uobičajeno skupina odraslih definira od 22 do 50 godina zabilježen je nešto veći broj oboljelih (10,4 %) u toj skupini. Broj oboljelih osoba starijih od 50 godina također nije zanemariv (6,1 %) [1, 5].

Uvođenje molekularne metode u rutinsku mikrobiološku dijagnostiku za *N. meningitidis* u KIB pokazalo se vrlo značajnim jer je u više od 50 % IMB etiološki uzročnik potvrđen samo metodom *real time* PCR. S obzirom na jasne preporuke za postupanje s oboljelima sa suspektom IMB i primjenu antibiotika unutar pola sata od postavljene sumnje, to je očekivano. Metoda omogućava potvrdu sumnje na IMB u vrlo kratkom vremenu, unutar samo nekoliko sati od uzimanja kliničkog uzorka.

Invazivnu meningokoknu bolest, u čak 85 % slučajeva, uzrokovala je *N. meningitidis* serogrupe B. Slično je i u nama susjednim zemljama (Austriji, Italiji, Mađarskoj), a nakon uvođenja cjepiva protiv *N. meningitidis* serogrupe C, i u Engleskoj i Španjolskoj [28]. U zapadnim, osobito zemljama sjevera, značaja je udio *N. meningitidis* serogrupe Y kao uzročnika IMB. Prvi takav izolat u KIB je zabilježen 2009. godine i od tada se godišnje zabilježi po jedan do dva izolata ove serogrupe, uglavnom u starijih osoba [29].

Testiranjem osjetljivost izolata na uobičajene antibiotike, pokazalo se da je sve više naših izolata u promatranom intervalu bilo smanjeno osjetljivo na penicilin. Naši izolati iz ranijih kolekcija, koje je ispitalo Taha 2006. godine na prisutnost *PenA* gena nisu tada pokazivali smanjenu osjetljivost [25]. Međutim, u našem radu smo pokazali da se ne radi samo o pojedinačnim izolatima koji su smanjeno osjetljivi na penicilin već i da vrijednost MIK_{90} za penicilin prelazi graničnu vrijednost za osjetljivost od 0,064 µg/mL. No, naši izolati su i dalje bili dobro osjetljivi na antibiotike koji se koriste u liječenju (ceftriakson) ili u profilaksi izloženih osoba (ciprofloksacin, rifampicin). Velika rezistencija izolata meningokoka je zabilježena na sulfometoksazol-trimetoprim koja je prisutna već duže vrijeme diljem svijeta.

U karakterizaciji izolata *N. meningitidis* posljednjih 10 do 15 godina napravljen je veliki iskorak [21]. Osnovni cilj nije samo epidemiološko ispitivanje i povezivanje epidemija, već želja da se omogući priprema sveobuhvatnog cjepiva posebice protiv serogrupe B. Mali broj naših izolata iz 2006. godine koje smo serotipizirali i serosubtipizirali pokazali su da je serogrupa B najčešće pripadala serotipu B:4 ili serosubtipu B:4:1.5. Dva izolata serogrupe C pokazala su da pripadaju najčešćem serotipu C:2b, ali različitim serosubtipovima (C:2b:1.2,5 i C:2b:1.6,15). S obzirom da se kod nas uvijek radilo o sporadičnim oboljevanjima, ovi podaci su nam samo bili važna informacija o kretanju sličnih serotipova u pojedinim serogrupama. Na temelju podatka o *PorA* tipu šest naših izolata bilo je tipa

P1.7-2,4 koji je bio zastupljen u novozelandskom cjepivu pripremljenom iz epidemijskog soja NZ98/254 cc41/44, B:4:P1.7-2,4. Dva izolata su bila tip P1.5,2-2 koji je bio sastavni dio heksavalentnog cjepiva u Nizozemskoj i dva izolata tipa P1.19,15 sastavnog dijela bivalentnog cjepiva proizvođača Glaxo Smith Kline. Ostali tipovi su se razlikovali u varijabilnoj regiji 2 ili 3 (VR2, VR3) [30, 31, 32].

U međuvremenu su istraživanja dovela do primjene reverzne vakcinologije u pripremi cjepiva i pojave novih kandidata za cjepivo (*factor H binding protein* – fHBP, *Neisserial heparin binding antigen* – NHBA, *Neisserial adhesin A* – NadA). Prvo obećavajuće sveobuhvatno cjepivo (Bexero, Novartis), koje sadrži ove tri komponente uz OMP P1.7-2,4 komponentu koja je bila temelj cjepiva protiv epidemije meningokoka u Novom Zelandu, službeno je prihvaćeno u veljači 2013. godine u Europi, a zatim i kolovozu u Australiji i Kanadi. I dok se još uvijek se očekuje uključivanje cjepiva protiv meningokoka grupe B u obavezne programe cijepjenja, na horizontu su i nove formulacije takvih cjepiva [33–37].

Zaključak

Uvođenjem metode *real time* PCR u rutinski rad mikrobiološkog laboratorija u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" značajno smo unaprijedili i ubrzali postavljanje etiološke dijagnoze IMB. Dijagnoza IMB je čak u 56,1 % oboljelih potvrđena isključivo *real time* PCR-om. Očekivano, IMB je u 85,1 % slučajeva uzorkovala *N. meningitidis* grupe B, a najčešće su oboljevala djeca do 2 odnosno 5 godina života. Pojava i razvoj rezistencije *N. meningitidis* na penicilin upućuje na potrebu praćenja kretanja gena rezistencije, *penA*, u invazivnim izolatima. Daljnja karakterizacija izolata *N. meningitidis* genotipiziranjem, iako ne od značaja za liječenje bolesnika i profilaksu kontakata oboljelog, bitna je za sve zemlje koje žele svojoj populaciji omogućiti prevenciju bolesti cijepjenjem. Formulacija novih multikomponentnih cjepiva zahtijeva detaljniju analizu kolekcije izolata svih zemalja, posebno kako bi se mogao utvrditi stupanj zaštićenosti koji bi se postigao primjenom određenog cjepiva protiv meningokoka grupe B, odnosno obećavajućeg sveobuhvatnog cjepiva.

Literatura

- [1] Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 1378–1388.
- [2] Spinosa MR, Progidia C, Tala A, Cogli L, Alifano P, Buccic C. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun* 2007; 75: 94–3603.

- [3] Stollenwerk N, Maiden MC, Jansen VA. Diversity in pathogenicity can cause outbreaks of meningococcal disease. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2004; 101: 10229–10234.
- [4] Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1997; 94: 271–276.
- [5] WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine – preventable diseases. WHO/V&B/03.01; 2003.
- [6] Yakubu DE, Abadi FJ, Pennington TH. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol* 1999; 48(12): 1055–64.
- [7] Orvelid P, Bäckman A, Olcén P. PCR identification of the group A *Neisseria meningitidis* gene in cerebrospinal fluid. *Scand J Infect Dis* 1999; 31(5): 481–3.
- [8] Taha MK. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 855–857.
- [9] Taha MK. Molecular detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2(2):143–50.
- [10] Taha MK, Alonso JM, Cafferkey M, et al. Interlaboratory comparison of PCR-based identification and genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 144–149.
- [11] Bennett DE, Cafferkey MT. Consecutive use of two multiplex PCR-based assays for simultaneous determination of capsular status of nine common *Neisseria meningitidis* serogroups associated with invasive disease. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1127–1131.
- [12] Fox AJ, Taha MK, Vogel U. Standardized nonculture techniques recommended for European reference laboratories. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31(1): 84–8.
- [13] Zhu H, Wang Q, Wen L, et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Genogrouping of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2012; 50(1): 46–51.
- [14] Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1553–1558.
- [15] Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(5): 386–90.
- [16] Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, et al. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology* 2011; 157(Pt 8): 2181–95.
- [17] Trucchi C, Zoppi G. Invasive bacterial diseases: national surveillance in Italy and vaccination coverage in the Local Health Agency 4 "Chiavarese", Liguria region (Italy). *J Prev Med Hyg* 2012; 53(2): 120–4.
- [18] Bechini A, Levi M, Boccalini S, et al. Present situation and new perspectives for vaccination against *Neisseria meningitidis* in Tuscany, Central Italy. *J Prev Med Hyg* 2012; 53(2): 61–7.
- [19] Van Looveren M, Caugant DA, Chapelle S, Carion F, Goossens H. Interpreting the rising incidence of meningococcal disease in Belgium: the contribution of molecular typing. *J Med Microbiol* 2001; 50(11): 986–90.
- [20] Brehony C, Jolley KA, Maiden MC. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 200; 31(1): 15–26.
- [21] Vogel U. Molecular epidemiology of meningococci: application of DNA sequence typing. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300(7): 415–20.
- [22] Vogel U. European efforts to harmonize typing of meningococci. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(8): 659–62.
- [23] Russell JE, Jolley K, Feavers IM, Maiden MCJ, Suker J. PorA Variable Regions of *Neisseria meningitidis*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(4): 674–78.
- [24] Taha MK, Zarantonelli ML, Neri A, Enriquez R, Vasquez JA, Stefanelli P. Interlaboratory Comparison of PCR-Based Methods for Detection of Penicillin G Susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(3): 887–892.
- [25] Taha MK, Vasquez JA, Hong E, et al. Target gene sequencing to characterize the penicillin G susceptibility of *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(8): 2784–2792.
- [26] Abdillahi H, Poolman J T. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 48: 367–371.
- [27] Tondella MLC, Popovic T, Rosenstein NE, et al. Distribution of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Serosubtypes and Serotypes Circulating in the United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3323–3328.
- [28] Jafri JZ, Ali A, Messonnier NE, et al. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. *Population Health Metrics* 2013; 11:17.
- [29] Bröker M, Bukovski S, Culic D, et al. Meningococcal serogroup Y emergence in Europe: High importance in some European regions in 2012. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(6): 1725–8.
- [30] Boutriau D, Poolman J, Borrow R, et al. Immunogenicity and safety of three doses of a bivalent (B:4:p1.19,15 and B:4:p1.7-2,4) meningococcal outer membrane vesicle vaccine in healthy adolescents. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(1): 65–73.
- [31] Hosking J, Rasanathan K, Mow FC, et al. Immunogenicity, Reactogenicity, and Safety of a P1.7b,4 Strain-Specific Serogroup B Meningococcal Vaccine Given to Preteens. *Clin And Vacc Immun* 2007; 14 (11): 1393–1399.
- [32] Holst J, Martin D, Arnold R, et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; 27S: B3–B12.
- [33] Danzig L. Reverse vaccinology in search of a genome-derived meningococcal vaccine. *Vaccine* 2006; 12;24(2): S2-11-2.
- [34] Holst J. Strategies for development of universal vaccines against meningococcal serogroup B disease: the most promising options and the challenges evaluating them. *Hum Vaccin* 2007; 3(6): 290–4.
- [35] Lucidarme J, Newbold LS, Findlow J, et al. Molecular targets in meningococci: efficient routine characterization and optimal outbreak investigation in conjunction with routine surveillance of the meningococcal group B vaccine candidate, fHBP. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(2): 194–202.
- [36] Lucidarme J, Comanducci M, Findlow J, et al. Characterization of fHbp, nhba (gna2132), nadA, porA, and sequence type in group B meningococcal case isolates collected in England and Wales during January 2008 and potential coverage of an investigational group B meningococcal vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(6): 919–29.
- [37] Serruto D, Bottomley MJ, Ram S, Giuliani MM, Rappuoli R. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine* 2012; 30(2): B87–97.ta